

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO NANO SELEN/OLIGOCHITOSAN BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ GAMMA Co-60 VÀ KHẢO SÁT ĐỘ ỔN ĐỊNH

Nguyễn Ngọc Duy^{*1}, Đặng Văn Phú¹, Lê Anh Quốc¹, Nguyễn Thị Kim Lan¹, Cao Văn Chung¹, Nguyễn Quốc Hiến¹, Trần Thị Thu Ngân²

¹Trung tâm Nghiên cứu và Triển khai Công nghệ Bức xạ

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: ngocduy158@gmail.com

Tóm tắt: Nano selen có kích thước hạt khoảng 41,75 nm được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 sử dụng oligochitosan làm chất ổn định. Các đặc trưng tính chất của dung dịch nano selen được xác định bằng quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis) và kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Nano selen/oligochitosan (SeNPs/OCS) dạng bột được chế tạo bằng phương pháp sấy phun và độ tinh khiết được xác định bằng phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX). Kết quả phân tích phổ EDX cho thấy SeNPs/OCS tạo ra có độ tinh khiết cao. Độ ổn định của dung dịch SeNPs/OCS theo thời gian lưu cũng được nghiên cứu. Kết quả cho thấy dung dịch SeNPs/OCS có độ ổn định tốt sau 60 ngày lưu trữ ở nhiệt độ 4°C. Ở nhiệt độ thường dung dịch SeNPs/OCS kém bền và keo tụ sau thời gian khoảng 15 ngày. SeNPs/OCS được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ tia γ có những ưu điểm như thân thiện với môi trường, có khả năng sản xuất với khối lượng lớn và có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực y sinh, mỹ phẩm cũng như các lĩnh vực khác.

Từ khóa: nano selen, oligochitosan, gamma Co-60.

1. MỞ ĐẦU

Selen là nguyên tố vi lượng quan trọng, nó có ảnh hưởng rộng rãi đến các hệ thống sinh học, bao gồm các hiệu ứng chống oxy hoá, phòng chống ung thư và các hoạt động kháng virus [1]. Sự thiếu hụt selen có thể dẫn đến một số bệnh nghiêm trọng như ung thư, tim mạch và rối loạn miễn dịch hoặc gây ức chế miễn dịch, trong khi đó việc bổ sung selen với liều thấp có thể làm tăng hoặc phục hồi các chức năng miễn dịch [1, 2]. Hàm lượng selen cần thiết trong chế độ ăn dinh dưỡng của người lớn là 50 - 200 $\mu\text{g}/\text{ngày}$ [2]. So với selen ở dạng ion, nano selen (SeNPs) có hoạt tính sinh khả dụng, hoạt tính sinh học cao hơn và độc tính thấp hơn [3, 4]. Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng SeNPs có độc tính cấp thấp hơn nhiều ở chuột với $\text{LD}_{50} \sim 91,2$ mg Se/kg thể trọng so với methylselenocystein có $\text{LD}_{50} \sim 14,6$ mg Se/kg thể trọng [5]. Gần đây, Zhai và cộng sự [6] cũng báo cáo rằng LD_{50} của SeNPs cho chuột Kunming là 258,2 mg/kg trong khi đó LD_{50} của H_2SeO_3 là 22 mg/kg. Ngoài ra, các nghiên cứu còn chỉ ra rằng SeNPs có tác dụng trong việc điều trị ung thư. Sonkusre và cộng sự [7] đã chứng minh rằng SeNPs có hiệu quả cao và đặc hiệu chống ung thư tuyến tiền liệt. Ali và cộng sự đã thử nghiệm và nhận thấy chuột được uống SeNPs có kích thước hạt trong khoảng 50-80 nm với liều lượng 0,2 mg/kg thể trọng có khả năng chống lại bệnh ung thư phổi [8]. Faghfuri và cộng sự [9] đã báo cáo rằng khối lượng khối u vú ở chuột bổ sung 200 μg SeNPs /ngày trong 60 ngày nhỏ hơn so với nhóm đối chứng không sử dụng SeNPs.

Có nhiều phương pháp đã được áp dụng để tổng hợp SeNPs từ ion Se như phương pháp khử hóa học sử dụng axit ascorbic, glutathione, hydrazine hydrate làm chất khử [4, 5, 10, 11], phương pháp sinh học sử dụng sinh khối vi khuẩn làm chất khử [8, 9], phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 dùng sodium dodecyl sulfate làm chất ổn định và etanol làm chất bắt gốc tự do [12, 13]. Trong đó, phương pháp chiếu xạ được xem là một phương pháp hiệu quả để tổng hợp SeNPs với những ưu điểm như: (1) phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ phòng, (2) hiệu suất tạo SeNPs cao, (3) SeNPs có độ tinh khiết cao do không tồn dư chất khử, (4) dễ dàng điều chỉnh kích thước hạt SeNPs bằng cách thay đổi liều và suất liều chiếu xạ, (5) có khả năng sản xuất với khối lượng lớn [12, 13].

Trong nghiên cứu này, SeNPs được tổng hợp bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 sử dụng oligochitosan (OCS), một polysaccharit có tính tương hợp sinh học, phân hủy sinh học, kháng khuẩn, kháng nấm và đặc biệt có khả năng tăng cường hệ miễn dịch, làm chất ổn định và khảo sát độ ổn định theo thời gian. Chế phẩm SeNPs/OCS có độ tinh khiết cao với khả năng tăng cường và phục hồi hệ miễn dịch được định hướng áp dụng trong thực phẩm chức năng để hỗ trợ phục hồi sức khỏe cho các bệnh nhân điều trị ung thư.

2. NỘI DUNG

2. 1. Đối tượng và Phương pháp

2.1.1. Đối tượng

Selen dioxit (SeO_2) dạng tinh khiết được mua từ hãng Merck, Đức. Oligochitosan dạng dung dịch là sản phẩm của Trung tâm Nghiên cứu và triển khai Công nghệ Bức xạ (Vinagamma) với nồng độ 3%, độ deacetyl $\sim 85\%$ và $M_w \sim 5.000$ g/mol.

2.1.2. Phương pháp

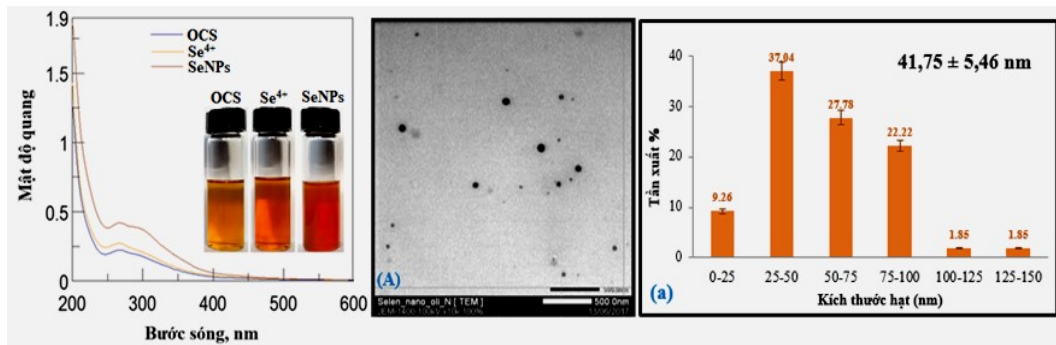
- *Chế tạo SeNPs/oligochitosan bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60*: Hòa tan một lượng SeO_2 vào trong dung dịch oligochitosan 3% và thêm nước vừa đủ để tạo thành dung dịch H_2SeO_3 2,5 mM/OCS 2%. Dung dịch sau đó được cho vào bình thủy tinh có nút vặn kín khí và chiếu xạ trên nguồn gamma SVST Co-60/B tại Trung tâm Vinagamma, TP. HCM trong khoảng liều cho đến 21 kGy [13].

- *Xác định các đặc trưng tính chất và độ ổn định theo thời gian của SeNPs/OCS*: Phổ hấp thụ của OCS và SeNPs/OCS được đo trên máy quang phổ UV-Vis, UV-2401PC (Shimadzu, Nhật Bản). Phân bố kích thước và kích thước của SeNP được xác định bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), JEM1010 (JEOL, Nhật Bản) và được tính toán thống kê từ khoảng 500 hạt [24]. SeNPs/OCS dạng bột được chế tạo bằng cách sấy phun dung dịch SeNPs/OCS với máy sấy phun ADL311 (Yamato, Nhật Bản). Hàm lượng selen và các nguyên tố có trong bột SeNPs/OCS được xác định bằng phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX) trên máy JEOL 6610 LA. Độ ổn định theo thời gian lưu giữ được xác định bằng sự thay đổi kích thước hạt và phân bố kích thước hạt được xác định bằng ảnh TEM.

2. 2. Kết quả

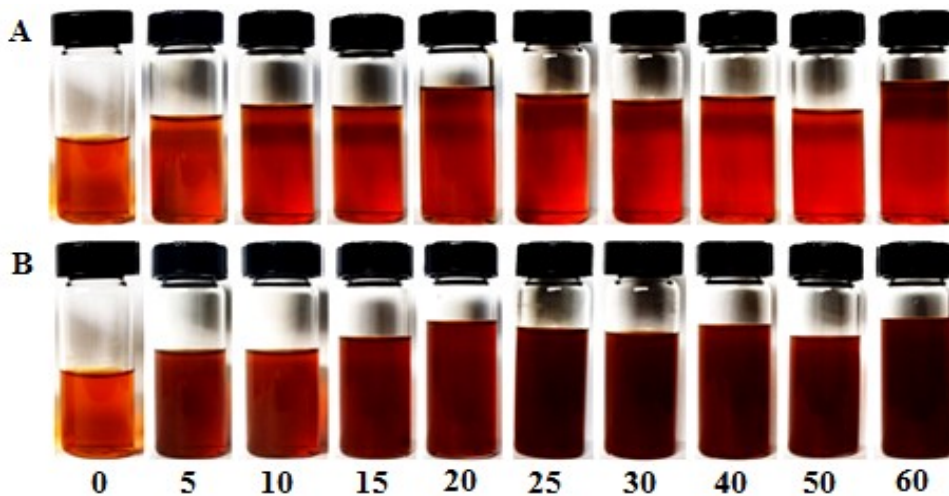
2.2.1. Đặc trưng tính chất của dung dịch SeNPs/OCS chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60

Nano selen được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma Co-60 với liều xạ 21 kGy, dùng oligochitosan 2% làm chất ổn định theo công trình của tác giả Hiến và cộng sự [13]. Kết quả phổ UV-Vis, màu sắc của dung dịch và ảnh TEM được thể hiện trong hình 1 cho thấy có sự thay đổi màu của dung dịch trước và sau chiếu xạ, từ màu vàng cam sang màu đỏ cam. Phổ UV-Vis cho thấy quang phổ ở cả 3 mẫu đều là đỉnh đơn, hẹp với cường độ yếu và đỉnh hấp thụ dao động tại $\lambda_{\text{max}} \sim 265 - 266,5$ nm. Các đỉnh đều là đỉnh hấp thụ của OCS còn Selen ion và SeNPs/OCS thì không có đỉnh hấp thụ đặc trưng. Kết quả ảnh TEM của dung dịch SeNPs/OCS cho thấy các hạt SeNPs có dạng hình cầu, kích thước trung bình khoảng $41,75 \pm 5,46$ nm.

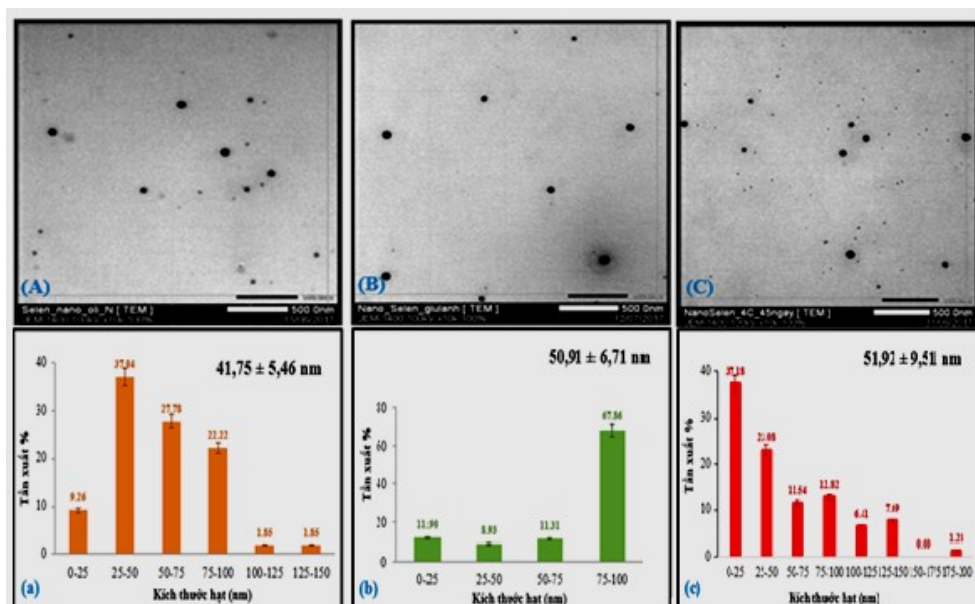


Hình 1. Phổ UV-Vis của dung dịch oligochitosan, selen ion, SeNPs và ảnh TEM của dung dịch SeNPs/OCS

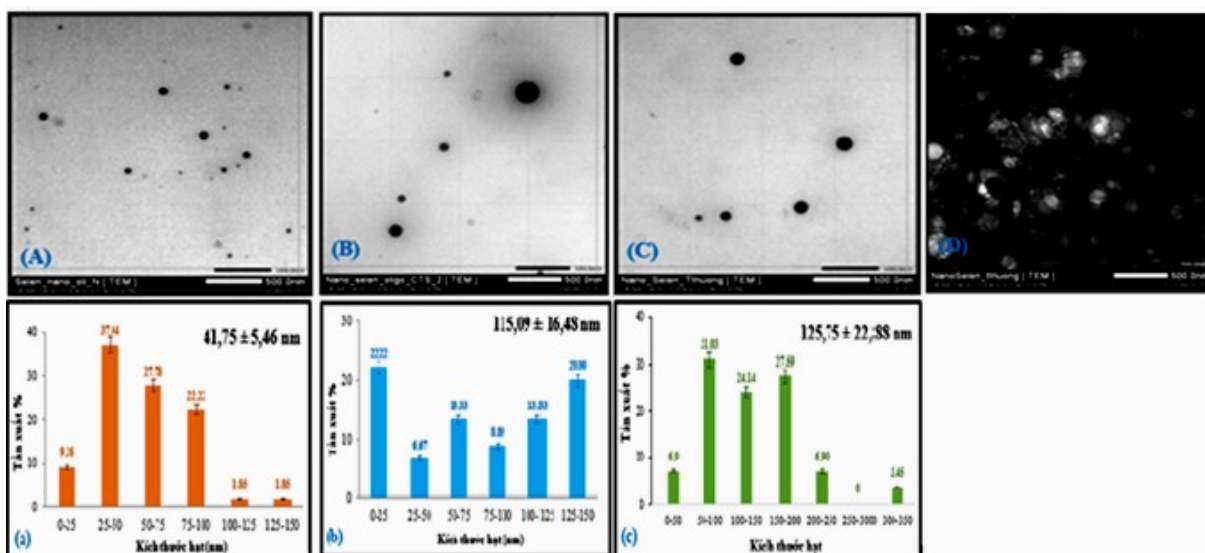
2.2.2. Độ ổn định theo thời gian của dung dịch SeNPs/OCS chế tạo bằng phương pháp gamma Co-60



Hình 2: Sự thay đổi màu sắc của dung dịch SeNPs/OCS bảo quản ở nhiệt độ 4°C (A) và 27°C (B) trong thời gian từ 0 ngày đến 60 ngày



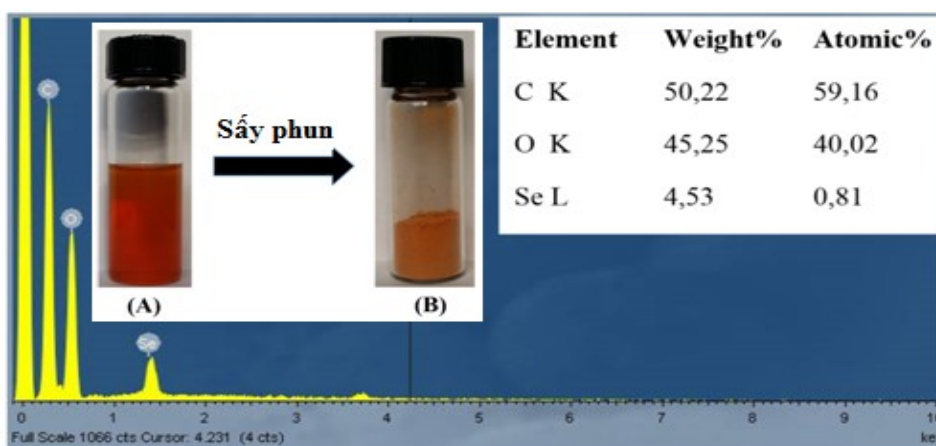
Hình 3: Ảnh TEM và đồ thị phân bố kích thước hạt của SeNPs/OCS bảo quản ở nhiệt độ 4°C theo thời gian: 0 ngày (A,a); 30 ngày (B,b) và 45 ngày (C,c)



Hình 4: Ảnh TEM và đồ thị phân bố kích thước hạt SeNPs/OCS bảo quản ở nhiệt độ 27°C theo thời gian: 0 ngày (A,a); 15 ngày (B,b); 30 ngày (C,c) và 45 ngày (D)

Kết quả theo dõi độ ổn định của dung dịch SeNPs/OCS trong thời gian 60 ngày ở nhiệt độ 4°C và 27°C được thể hiện trong hình 2, 3 và 4. Kết quả cho thấy, khi bảo quản dung dịch ở nhiệt độ 4°C thì có sự ổn định về màu sắc (màu đỏ cam) và hầu như không thay đổi trong 60 ngày. Ở nhiệt độ 27°C, màu sắc chuyển đổi từ đỏ cam sang nâu đỏ và xuất hiện cặn lắng ở ngày thứ 25 trở đi (hình 2). Kết quả ảnh TEM cho thấy kích thước hạt SeNPs tăng dần theo thời gian lưu giữ. Ở nhiệt độ 27°C kích thước hạt SeNPs tăng nhanh hơn so với khi lưu giữ ở 4°C. Cụ thể là kích thước hạt SeNPs tăng từ $41,75 \pm 5,46$ nm (0 ngày) lên $50,91 \pm 6,71$ và $51,92 \pm 9,51$ nm tương ứng với thời gian bảo quản là 30 ngày và 45 ngày. Trong khi đó, kích thước hạt của SeNPs lưu giữ ở 27°C tăng nhanh lên tới $115,09 \pm 16,48$ và $125,75 \pm 22,88$ nm tương ứng với thời gian bảo quản là 15 và 30 ngày. Ở thời gian 45 ngày mẫu keo tụ, kết dính lại với nhau và hầu như không thể xác định kích thước hạt bằng ảnh TEM.

2.2.3. Chế tạo SeNPs/OCS dạng bột bằng phương pháp sấy phun



Hình 5. (A) Dung dịch SeNPs/OCS, (B) SeNPs/OCS dạng bột và phổ EDX của bột SeNPs/OCS

Dung dịch SeNPs/OCS sau chiếu xạ để ổn định trong 24 giờ và sau đó đem đi sấy phun tạo thành dạng bột mịn có màu cam đậm như hình 4. Phổ EDX cho thấy bột SeNPs/OCS chỉ chứa 3 nguyên tố là selen (4,53%), cacbon (45,25%) và oxy (50,22%).

2.3. Bàn luận

Sau khi chiếu xạ màu của dung dịch H_2SeO_3 2,5 mM/OCS 2% chuyển từ màu vàng nhạt sang màu đỏ cam (Hình 1) chứng tỏ quá trình khử ion selen thành SeNPs đã diễn ra. Nguyên nhân là do nước bị xạ ly tạo thành các tác nhân có tính khử mạnh như e^- và H^\bullet nên dễ dàng khử Se^{4+} thành Se^0 . Tuy nhiên, phổ UV-Vis của mẫu SeNPs không có đỉnh hấp phụ đặc trưng giống như các nano kim loại khác như bạc ($\lambda_{\text{max}} \sim 400\text{-}500$ nm), vàng ($\lambda_{\text{max}} \sim 520\text{-}570$ nm). Theo Lin, Wang [14], Shah và cộng sự [15], các SeNPs có đường kính nhỏ hơn 100 nm không có đỉnh hấp phụ đặc trưng (λ_{max}) ở vùng bước sóng 200-800 nm. Kết quả về phổ UV-Vis và kích thước hạt cũng phù hợp với các kết quả của các nhóm tác giả Hiến và cộng sự (2018) [13], Kong và cộng sự (2014) [16], Bai và cộng sự (2017) [17].

Các hạt nano selen sau khi được tạo thành sẽ được ổn định kích thước hạt bằng oligochitosan. Cũng giống như các polysaccarit khác alginate, dextran, gelatin,... oligochitosan có các nhóm chức giàu điện tử như nhóm $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ sẽ ổn định các hạt SeNPs thông qua liên kết phối trí và lực đẩy tĩnh điện [6]. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến độ ổn định của dung dịch SeNPs như nồng độ H_2SeO_3 , pH, nồng độ chất ổn định,.. [12, 13]. Trong đó, nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến độ ổn định cũng như các đặc trưng tính chất của dung dịch SeNPs/OCS trong quá trình bảo quản. Ở nhiệt độ thấp (4°C) màu sắc của dung dịch SeNPs hầu như không thay đổi trong thời gian 60 ngày và kích thước hạt có sự tăng nhẹ từ 41,75 đến 51,92 nm trong 45 ngày lưu giữ. Trong khi đó, tại nhiệt độ 27°C màu sắc của dung dịch có sự thay đổi rõ rệt từ màu vàng nhạt sang màu cam đậm và có hiện tượng keo tụ sau 25 ngày lưu giữ. Kích thước hạt tăng mạnh lên 125,75 nm sau 30 ngày lưu giữ. Điều này được giải thích là do tại nhiệt độ thấp chuyển động Brown bị hạn chế, khi nhiệt độ tăng sẽ làm tăng chuyển động Brown, dẫn đến tăng xác suất va chạm giữa các hạt SeNPs, làm cho các hạt kết dính lại với nhau từ đó gây ra hiện tượng keo tụ làm màu của dung dịch đậm lên và kích thước hạt cũng tăng lên [12, 13]. Kết quả theo thời gian lưu giữ kích thước hạt càng ngày càng lớn dần và sau 45 ngày các hạt SeNPs trong dung dịch được lưu giữ tại 27°C phần lớn đã keo tụ và kết quả ảnh TEM trong hình 4 (D) đã minh chứng cho sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến kích thước hạt SeNPs. Xu hướng tăng kích thước hạt SeNPs theo thời gian bảo quản và dẫn đến màu sắc dung dịch (màu đỏ cam) đậm dần cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Lin và Wang (2005) [14], Bai và cộng sự [17].

Từ kết quả trên có thể nhận thấy nhiệt độ thích hợp để bảo quản dung dịch SeNPs/OCS là 4°C . Tuy nhiên, phải tiêu tốn năng lượng để hạ nhiệt độ nhằm bảo quản dung dịch là điểm hạn chế cho khả năng ứng dụng của dung dịch SeNPs/OCS. Ngoài ra, việc lưu trữ và vận chuyển dung dịch SeNPs/OCS không phải lúc nào cũng thuận tiện. Để khắc phục các khuyết điểm trên cũng như mở rộng phạm vi ứng dụng của nano selen, SeNPs dạng bột đã được chế tạo. Kết quả trong hình 4 cho thấy bột SeNPs/OCS được tạo ra bằng kỹ thuật sấy phun từ dung dịch SeNPs/OCS có độ tinh khiết cao với thành phần chỉ có 3 nguyên tố là oxi, cacbon và selen. Với độ tinh khiết cao, bột SeNPs rất thích hợp cho các ứng dụng trong y sinh và dược phẩm.

3. KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu chế tạo được SeNPs có nồng độ 2,5 mM, kích thước hạt ~ 42 nm sử dụng oligochitosan làm chất ổn định bằng phương pháp chiếu xạ $\gamma\text{-Co-60}$. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ ổn định của dung dịch SeNPs/OCS cho thấy nhiệt độ thích hợp để bảo quản dung dịch SeNPs/OCS là 4°C . Để tăng cường độ ổn định cũng mở rộng các ứng dụng, SeNPs/OCS dạng bột được chế tạo bằng phương pháp sấy phun. Bột SeNPs/OCS với độ tinh khiết cao rất có triển vọng ứng dụng làm chất bổ sung trong thực phẩm chức năng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. H.W. Tan, H.Y. Mo, A.T.Y. Lau, Y.M. Xu. "Selenium Species: Current Status and Potentials in Cancer Prevention and Therapy", *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 1-26, 2019.
2. S. Skalickova, V. Milosavljevic, K. Cihalova, et al. "Selenium nanoparticles as a nutrition supplement", *Nutrition*, 33, 83-90, 2017.
3. C. Pelyhe, M. Mézes. "Myths and facts about the effects of nano-selenium in farm animals- mini review", 12(2), 1049-1052, 2013.
4. J. Zhang, H. Wang, X. Yan, L. Zhang. "Comparison of short-term toxicity between nano-Se and selenite in mice", *Life Sciences*, 76(10), 1099-1109, 2005.
5. J. Zhang, X. Wang, T. Xu. "Elemental selenium at nano size (nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with S-methylselenocysteine in mice", *Toxicological Sciences*, 101(1), 22-31, 2008.
6. X. Zhai, C. Zhang, G. Zhao, S. Stoll, F. Ren, X. Leng. "Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan", *Journal of nanobiotechnology*, 15:4, 2017.
7. P. Sonkusre, R. Nanduri, P. Gupta, S.S. Cameotra. "Improved extraction of intracellular biogenic selenium nanoparticles and their specificity for cancer chemoprevention", *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 5:2, 1000194, 2014.
8. E.N. Ali, S.M. El-Sonbaty, F.M. Salem. "Evaluation of selenium nanoparticles as a potential chemopreventive agent against lung carcinoma", *International Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 2(4), 38-46, 2013.
9. E. Faghfuri, M.H. Yazdi, M. Mahdavi, Z. Sepehrizadeh, M.A. Faramarzi, F. Mavandadnejad, A.R. Shahverdi. "Dose-response relationship study of selenium nanoparticles as an immunostimulatory agent in cancer-bearing mice", *Archives of medical research*, 46(1), 31-37, 2015.
10. Y. He, S. Chen, Z. Liu, C. Cheng, H. Li, M. Wang. "Toxicity of selenium nanoparticles in male Sprague-Dawley rats at supranutritional and nonlethal levels", *Life Sciences*, 115(1-2), 44-51, 2014.
11. S.K. Mehta, S. Chaudhary, S. Kumar, K.K. Bhasin, K. Torigoe, H. Sakai, M. Abe. "Surfactant assisted synthesis and spectroscopic characterization of selenium nanoparticles in ambient conditions", *Nanotechnology* 19(29):295601, 2008.
12. Y. Zhu, Y. Qian, H. Huang, M. Zhang. "Preparation of nanometer-size selenium powders of uniform particle size by γ -irradiation", *Materials Letters*, 28(1-3), 119-122, 1996.
13. N.Q. Hien, P.D. Tuan, D.V. Phu, L.A. Quoc, N.T.K. Lan, N.N. Duy, T.T. Hoa. "Gamma Co-60 ray irradiation synthesis of dextran stabilized selenium nanoparticles and their antioxidant activity", *Materials Chemistry and Physics*, 205, 29-34, 2018.
14. Z.H. Lin, C.R.C. Wang. "Evidence on the size-dependent absorption spectral evolution of selenium nanoparticles", *Materials Chemistry and Physics*, 92(2-3), 591-594, 2005.
15. C. Shah, M. Kuma, K.K. Pushpa, P.N. Bajai." Acrylonitrile-Induced Synthesis of Polyvinyl Alcohol-Stabilized Selenium Nanoparticles", *Crystal Growth & Design*, 8(11), 4159 – 4164, 2008.
16. H. Kong, J. Yang, Y. Zhang, Y. Fang, K. Nishinari, G.O. Philips. "Synthesis and antioxidant properties of gum arabic-stabilized selenium nanoparticles", *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 155-162, 2014.
17. K. Bai, B. Hong, J. He, Z. Hong, R. Tan. "Preparation and antioxidant properties of selenium nanoparticles-loaded chitosan microspheres", *International Journal of Nanomedicine*, 21:12:4527-4539, 2017.

STUDY ON THE PREPARATION OF SELENIUM NANOPARTICLES BY GAMMA CO-60 METHOD AND INVESTIGATE THE STABILITY

Nguyen Ngoc Duy¹, Dang Van Phu¹, Le Anh Quoc¹, Nguyen Thi Kim Lan¹, Cao Văn Chung, Nguyen Quoc Hien¹, Tran Thi Thu Ngan²
Email: ngocduy158@gmail.com

¹*Research and Development Center for Radiation Technology, Viet Nam Atomic Energy Institute, 202A,*

²*University of Science, 227 Nguyen Van Cu, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam*

Abstract: Selenium nanoparticles (SeNPs) with size ~ 41.75 nm were synthesized by γ -irradiation method using oligochitosan (OCS) as stabilizer. The SeNPs/OCS samples were characterized by UV-Vis spectra and transmission electron microscope (TEM) images. The SeNPs/OCS powder was also prepared by spray drying technique and the purity was verified by energy dispersive X-ray (EDX) analysis. The results of EDX spectrum showed that SeNPs/OCS solution has high purity. Stability of SeNPs/OCS was investigated. The results indicated that SeNPs/OCS solution was quite stable after 60 days of storage at 4°C. At normal temperature, the SeNPs/OCS solution was unstable and agglomerated after about 15 days. The SeNPs/OCS synthesized by γ -irradiation with the advantages of environmental friendly and mass production process may be potentially promising for applications in medicines, cosmetics and in other fields as well.

Keywords: *Selenium, Nanoparticles, oligochitosan, gamma Co-60.*